



DEUTSCHES
PATENTAMT

Offenlegungsschrift
DE 43 30 960 A 1

21 Aktenzeichen: P 43 30 960.7
22 Anmeldetag: 9. 9. 93
43 Offenlegungstag: 16. 3. 95

51 Int. Cl. 6:
A01 H 5/00
A 01 H 1/06
C 12 N 15/82
C 12 N 15/56
C 12 N 5/10
// A23L 1/0522

DE 43 30 960 A 1

11 Anmelder:
Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH,
14195 Berlin, DE

72 Erfinder:
Kosmann, Jens, Dr., 10715 Berlin, DE; Virgin, Ivan,
Dr., 13353 Berlin, DE

64 Kombination von DNA-Sequenzen, die in Pflanzenzellen und Pflanzen die Bildung hochgradig amylosehaltiger Stärke ermöglichen, Verfahren zur Herstellung dieser Pflanzen und die daraus erhaltbare modifizierte Stärke

57 Es wird eine Kombination von DNA-Sequenzen beschrieben, die in transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen den Amylosegehalt der Stärke dahingehend verändert, daß eine hochgradig amylosehaltige Stärke gebildet wird. Es wird des weiteren ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, die bezüglich des Amylosegehalts der natürlich enthaltenen Stärke infolge Expression künstlich eingeführter DNA-Sequenzen verändert sind sowie die über dieses Verfahren erhältlichen Pflanzen und die aus diesen Pflanzen erhaltbare hochgradig amylosehaltige Stärke beschrieben.

DE 43 30 960 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01.95 408 081/292

13/33

strate mit zwei oder mehr Einheiten überträgt und dabei ausschließlich α -1,4 Bindungen erzeugt. Das Substrat muß aus mindestens drei Einheiten aufgebaut sein, bezüglich des Akzeptors besteht eine geringe Spezifität. Takaha et al. (1993, J Biol Chem 268 : 1391 - 1396) beschreiben die Reinigung des D-Enzyms von Kartoffel (EC 2.4.1.25) sowie die Klonierung einer cDNA. Das gereinigte Enzym akzeptiert Glukose als Empfänger der zu übertragenden Kette, jedoch muß der Donor aus mindestens drei Glukoseeinheiten aufgebaut sein. Die Autoren beschreiben nicht, welche Art von Bindung bei der Transglykosylierung entsteht und gehen davon aus, daß das D-Enzym oder "Disproportionierende Enzym" am Stärkeabbau beteiligt ist.

Es ist bisher nicht bekannt, wie eine Pflanze gezielt dahingehend verändert werden kann, daß in ihr eine hochgradig amylosehaltige Stärke produziert werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Kombination von DNA-Sequenzen bereitzustellen, mit deren Hilfe Pflanzen dahingehend verändert werden können, daß sie eine hochgradig amylosehaltige Stärke produzieren. Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, transgener Pflanzen mit hochgradig amylosehaltiger Stärke sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Pflanzen bereitzustellen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß durch eine Kombination bekannter DNA-Sequenzen eines Verzweigungszyklus (WO 92/14827) mit DNA-Sequenzen eines Disproportionierungszyklus und Einführung dieser Kombination in ein pflanzliches Genom unter Verwendung rekombinanter Plasmide, Pflanzen erzeugt werden können, die befähigt sind, eine hochgradig amylosehaltige Stärke zu produzieren.

Eine Kombination von DNA-Sequenzen, die ein Verzweigungszyklus kodieren mit solchen, die ein Disproportionierungszyklus kodieren, zur genetischen Veränderung von Pflanzenzellen und Pflanzen mit dem Ziel, eine hochgradig amylosehaltige Stärke in den genetisch veränderten Pflanzen zu bilden, wurde bisher nicht beschrieben. Der Effekt, den die Einführung der neuen Kombination von DNA-Sequenzen in ein pflanzliches Genom auf den Amylosegehalt der Stärke ausübt, ist überraschend, da es bislang keinen Anhaltspunkt für eine Beteiligung des D-Enzyms an der Produktion verzweigter Stärke gibt. Nach den Befunden von Peat et al. (1956) besitzt das D-Enzym nämlich nicht die Fähigkeit zum Aufbau von α -1,6 Bindungen. Bei der Untersuchung der enzymatischen Aktivität des D-Enzyms wurde eine Proteinpräparation aus Kartoffelknollen verwendet, die neben dem Disproportionierungszyklus auch das Q-Enzym enthält. Eine Trennung der beiden enzymatischen Aktivitäten war nicht möglich. Die Unterscheidung der beiden Aktivitäten beruhte auf der Bestimmung unterschiedlicher Temperaturoptima für die katalysierten Reaktionen, wobei die Zunahme der Absorption eines Glukan/Jod-Komplexes bei Inkubation von Maltopentaose als spezifisch für die Aktivität des Disproportionierungszyklus angesehen wurde. Die Aktivität des Q-Enzyms wurde demgegenüber am Rückgang der spezifischen Färbung des Jod/Amylose-Komplexes nachgewiesen.

Ein Nachweis der Beteiligung des D-Enzyms an der Amylopektinproduktion ist in Kartoffelpflanzen, die eine Q-Enzymaktivität aufweisen, nicht möglich, da eine eindeutige Zuordnung der α -1,6 Bindungen synthetisierenden Aktivität zu einem der beiden Enzyme nicht möglich ist.

Mit der erfindungsgemäßen Kombination von DNA-Sequenzen, die aus

- a) der Kodierregion eines Verzweigungszyklus und
- b) der Kodierregion eines Disproportionierungszyklus

besteht, die jeweils derart in antisense Orientierung an geeignete Promotoren fusioniert sind, daß deren Transkription in transgenen Pflanzen zu Transkripten führt, kann der Amylosegehalt natürlich in Pflanzen enthaltener Stärke dahingehend verändert werden, daß eine hochgradig amylosehaltige Stärke gebildet wird.

Die Kombination der DNA-Sequenzen besteht vorzugsweise aus den Kodierregionen des Verzweigungs- und Disproportionierungszyklus von *Solanum tuberosum*, wobei die Kodierregion des Verzweigungszyklus die auf dem rekombinanten Plasmid p35S-anti-BE (DSM 6144) lokalisierte Sequenz und die Kodierregion des Disproportionierungszyklus die auf dem rekombinanten Plasmid p35SH-anti-D (DSM 8479) lokalisierte Sequenz ist.

Die rekombinanten DNA-Sequenzen führen bei gleichzeitiger oder aufeinanderfolgender Einführung in ein pflanzliches Genom in transgenen Pflanzen zur Bildung von Transkripten, die die Bildung von Enzymen des Stärkemetabolismus dahingehend verändern, daß bei der Stärkebiosynthese die Bildung von Amylopektin unterdrückt ist und dadurch die Bildung einer hochgradig amylosehaltigen Stärke ermöglicht wird.

Es ist auch möglich, die Kodierregionen des Verzweigungs- und des Disproportionierungszyklus mit Hilfe eines Plasmids in das pflanzliche Genom einzuführen.

Transgene Pflanzen, die hochgradig amylosehaltige Stärke bilden, können über

- A) ein einstufiges Verfahren hergestellt werden, daß die folgenden Schritte beinhaltet:

- a) Herstellung einer Kombination von DNA-Sequenzen aus folgenden Teilsequenzen:

- i) je einem Promotor, der in Pflanzen aktiv ist und die Bildung einer RNA im vorgesehenen Zielgewebe oder den Zielzellen sicherstellt,
- ii) je einer Kodierregion eines Verzweigungszyklus und eines Disproportionierungszyklus, derart an den unter i) genannten Promotor fusioniert, daß ein Transkript vom nicht-kodierenden Strang gebildet wird (antisense-Fusion) und
- iii) je einer 3'-nichttranslatierten Sequenz, die in Pflanzenzellen zur Beendigung der Transkription sowie zur Addition von poly-A Resten an das 3'-Ende der RNA führt, derart an die unter ii) genannte Sequenz fusioniert, daß die 3'-nicht-translatierte Sequenz an das 3'-Ende des unter ii) genannten nichtkodierenden Stranges anschließt,

- b) Transfer und Einbau der Kombinationen von DNA-Sequenzen in ein pflanzliches Genom unter Verwendung rekombinanter Plasmide zur Erzeugung transgener Pflanzenzellen und

Translationsinhibition hängt u. a. von der Menge der in der Zelle wirksamen antisense Transkripte ab. Zur Stabilisierung der Transkripte, die von der eingeführten Kombination von DNA-Sequenzen gebildet werden, wird daher an die Kodierregionen von Verzweigungsenzym und Disproportionierungsenzym ein Terminations- und Polyadenylierungssignal angehängt. Dies kann beispielsweise das Terminationsignal des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* sein.

Durch Fusion von Promotor, Kodierregion des Verzweigungs- bzw. des Disproportionierungsenzyms und Terminationssignals entstehen Konstrukte, die zur Transformation von Pflanzen in geeignete Plasmide integriert werden. Diese rekombinanten Plasmide können die Kombination der Fusion enthalten oder jeweils ein Element der Kombination. Wenn die rekombinanten Plasmide beide Elemente der Kombination enthalten, können transgene Pflanzen, die die erfindungsgemäße Kombination von DNA-Sequenzen enthalten, in einem einstufigen Verfahren hergestellt werden. Wenn die rekombinanten Plasmide jeweils ein Element der Kombination enthalten, können sie nacheinander zur Transformation eingesetzt werden, so daß transgene Pflanzen, die die erfindungsgemäße Kombination von DNA-Sequenzen enthalten, in einem zweistufigen Verfahren hergestellt werden können.

Für die Transformation werden die DNA-Sequenzen zunächst in Pflanzenzellen integriert, aus denen anschließend ganze Pflanzen regeneriert werden. Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäße DNA-Sequenz-Kombination enthalten, sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Infolge der Übertragung der neuen Kombination von DNA-Sequenzen, die je einen Promotor, je eine Kodierregion des Verzweigungs- und des Disproportionierungsenzyms in antisense-Orientierung zum Promotor und je ein Terminations-/Polyadenylierungssignal enthalten, kommt es in den transgenen Pflanzen zur Bildung zweier RNA, die durch Wechselwirkung mit den endogenen mRNA des Verzweigungsenzyms und des Disproportionierenden Enzyms deren Synthese unterdrücken. Dadurch wird eine hochgradig amylosehaltige Stärke zugänglich.

Amylose zeichnet sich durch eine stark geordnete Raumstruktur aus, was insbesondere günstige Auswirkungen auf die Filmbildungseigenschaften hat. Besonders geeignet für die Produktion von Amylose unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Kombination von DNA Sequenzen des Verzweigungs- und des Disproportionierenden Enzyms ist Kartoffel. Die Anwendung der Erfindung ist aber nicht auf Kartoffel beschränkt, sondern kann auch an anderen stärke-speichernden Nutzpflanzen erfolgen (s. o.).

Die in den transgenen Pflanzen gebildete hochgradig amylosehaltige Stärke kann mit gängigen Methoden aus den Pflanzen oder aus den Pflanzenzellen isoliert und nach der Reinigung zur Herstellung von Nahrungsmitteln und industriellen Produkten verarbeitet werden.

Hinterlegungen

Am 20.08.1990 wurde das Plasmid p35S-anti-BE (DSM 6144), am 26.08.1993 wurde das Plasmid p35SH-anti-D (DSM 8479) bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland hinterlegt.

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt das 13,6 kb große Plasmid p35S-anti-BE (DSM 6144). Das Plasmid enthält folgende Fragmente:
A = Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV), Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV

B = Fragment B (2909 bp) beinhaltet ein DNA-Fragment mit der Kodierregion des Verzweigungsenzyms von *Solanum tuberosum*
C = Fragment (192 bp) beinhaltet das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTi-ACH5, Nukleotide 11749-11939

Fig. 2 zeigt das 12,165 kb große Plasmid p35SH-anti-D (DSM 8479). Das Plasmid enthält folgende Fragmente:
A = Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV), Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV

B = Fragment B (1474 bp) beinhaltet ein DNA-Fragment mit der Kodierregion des Disproportionierenden Enzyms von *Solanum tuberosum*

C = Fragment (192 bp) beinhaltet das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTi-ACH5, Nukleotide 11749-11939

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden vorab die wichtigsten eingesetzten Verfahren erläutert.

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC18 (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119) benutzt.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor BIN19 (Bevan (1984) Nucl Acids Res 12, 8711-8720) kloniert.

2. Bakterienstämme

Für die pUC-Vektoren wurden die *E. coli*-Stämme BMH71-18 (Messing et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74, 6342-6346) oder TB1 benutzt. TB1 ist ein Rekombinations-negatives, Tetracyclin-resistentes Derivat des Stammes JM 101 (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119). Der Genotyp des TB1-Stammes ist (Bart

Schnittstelle mit Hilfe der DNA-Polymerase wurde das Fragment in die SmaI-Schnittstelle des zuvor beschriebenen Derivats pBIN19-AC ligiert (s. Fig. 1).

Ausführungsbeispiel 2

Konstruktion des Plasmids p35SH-anti-D

Unter Verwendung zweier synthetisch hergestellter DNA-Oligonukleotide der Sequenzen:

5'-GCCCCCGGGCTTTTAAGTTCCTTG-3'

und

5'-CAGGGTACCTAACATCTTAATCATC-3'

als Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion an cDNA aus Knollengewebe von *Solanum tuberosum* wurde eine Kopie der Kodierregion des Disproportionierungsenzyms erzeugt, die wegen der spezifischen Sequenz der Oligonukleotide am 3' Ende des kodogenen Stranges mit einer KpnI-Schnittstelle und an dessen 5' Ende mit einer SmaI-Schnittstelle ausgestattet ist. Mit Hilfe dieser beiden Schnittstellen ist es möglich, die Kodierregion des Disproportionierungsenzyms in antisense Orientierung zwischen die KpnI- und die SmaI-Schnittstelle des binären Plasmids pBIN19-HYG zu klonieren. Das Plasmid pBIN19-HYG trägt das hphI-Gen für Hygromycinresistenz in der T-DNA. Die Verwendung dieses Plasmids ist notwendig, um Pflanzen, die bereits mit einem pBIN19-Derivat transformiert wurden, einer erneuten Transformation und Selektion unterziehen zu können. Für die Herstellung des Plasmids p35SH-anti-D wurde ein Derivat von pBIN19-HYG verwendet, das entsprechend der in Ausführungsbeispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise mit den dort beschriebenen Fragmenten A und C ausgestattet worden war. Dies hatte zu dem Plasmid pBIN19-HYG-AC geführt.

Durch Ligation des mit KpnI und SmaI geschnittenen Produkts der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der Kodierregion des Disproportionierungsenzyms zwischen die KpnI- und SmaI-Schnittstellen von pBIN19-HYG-AC entstand das Plasmid p35SH-anti-D (s. Fig. 2), das wie das in Ausführungsbeispiel 1 beschriebene Plasmid p35S-anti-BE aus drei Fragmenten A, B und C, insertiert in den Polylinker von pBIN19-HYG-AC, besteht. Die Fragmente A und C sind mit den entsprechenden in Ausführungsbeispiel 1 identisch, das Fragment B beinhaltet die Nukleotide 1777 bis 303 des Disproportionierungsenzyms von *Solanum tuberosum* (Takaha et al., 1993).

Ausführungsbeispiel 3

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit binären Plasmiden und genetische Veränderung von Pflanzen mit Hilfe transformierter *Agrobacterien*.

Zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden die binären Plasmide aus den Ausführungsbeispielen 1 bzw. 2 durch direkte Transformation nach der Methode von Höfigen & Willmitzer (1988, Nucl Acids Res 16: 9877) in die Zellen eingeführt. Die Plasmid-DNA transformierter *Agrobakterien* wurde nach der Methode von Birnboim et al. (1979, Nucl Acids Res 7: 1513—1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

Agrobakterien, bei denen die Integrität der in den Ausführungsbeispielen 1 und 2 beschriebenen binären Plasmide nach der Transformation durch Restriktionsanalyse nachgewiesen worden war, wurden zur genetischen Veränderung von Pflanzen eingesetzt.

Zur Transformation z. B. von Kartoffel pflanzen werden beispielsweise 10 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Sterilkultur in 10 ml MS-Medium mit 2% Saccharose gelegt, welches 30—50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthält. Nach 3—5 minütigem, leichtem Schütteln werden die Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Tagen werden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 2 mg/l Zeatinribiose, 0,02 mg/l Naphthylthylsäure, 0,02 mg/l Gibberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wird die Claforankonzentration im Medium um die Hälfte reduziert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie von Rocha-Sosa et al. (1989, EMBO J 18: 29) beschrieben.

Um die erfindungsgemäße Kombination von DNA-Sequenzen in Pflanzen einzuführen und diese zur Produktion einer hochgradig amylosehaltigen Stärke zu veranlassen, wurden zwei aufeinanderfolgende Transformationen nach der oben angegebenen Vorschrift durchgeführt.

Dabei wurde zweckmäßig zunächst mit dem in Ausführungsbeispiel 1 beschriebenen Plasmid transformiert, da der Erfolg der antisense-Inhibition der Bildung des Verzweigungsenzyms leicht mit dem in Ausführungsbeispiel 1 beschriebenen Antisensur vorgenommen werden kann.

Solche Pflanzen, bei denen kein Verzweigungsenzym mehr nachweisbar ist, werden für eine Superinfektion mit dem Plasmid p35SH-anti-D eingesetzt. Anstelle des Kanamycins wird nun zur Selektion Hygromycin in einer Konzentration von 3 mg/l verwendet.

Die Überprüfung des Erfolgs der genetischen Veränderung der Pflanzen ist durch Analyse der Gesamt-RNA bezüglich des Ausbleibens der mRNA des Q- und des D-Enzyms möglich. Im Falle der mit dem Konstrukt 35SH-anti-D transformierten Pflanzen wurde diese Nachweismethode verwendet. Die Isolierung pflanzlicher Gesamt-RNA erfolgt nach Logemann et al. (1987, Anal Biochem 163: 16—20). Für die Analyse werden je 50 µg

- vi) einer 3'-nichttranslatierten Sequenz, die in Pflanzenzellen zur Beendigung der Transkription sowie zur Addition von poly-A Resten an das 3'-Ende der RNA führt, derart an die unter v) genannte Sequenz fusioniert, daß die 3'-nichttranslatierte Sequenz an das 3'-Ende des unter v) genannten nichtkodierenden Stranges anschließt,
- in das Genom einer Pflanzenzelle unter Verwendung eines rekombinanten Plasmids transfertiert und eingebaut wird, aus der so genetisch veränderten Pflanzenzelle eine ganze Pflanzenzelle regeneriert und anschließend in Zellen dieser genetisch veränderten Pflanzen durch erneute Transformation eine weitere DNA-Sequenz, bestehend aus den Teilstücken:
- vii) einem Promotor, der in Pflanzen aktiv ist und die Bildung einer RNA im vorgesehenen Zielgewebe oder den Zielzellen sicherstellt,
 - viii) einer Kodierregion eines Disproportionierungs- oder Verzweigungsenzyms, derart an den unter vii) genannten Promotor fusioniert, daß ein Transkript vom nicht-kodierenden Strang gebildet wird (antisense-Fusion) und
 - ix) einer 3'-nichttranslatierten Sequenz, die in Pflanzenzellen zur Beendigung der Transkription sowie zur Addition von poly-A Resten an das 3'-Ende der RNA führt, derart an die unter viii) genannte Sequenz fusioniert, daß die 3'-nicht-translatierte Sequenz an das 3'-Ende des unter viii) genannten nichtkodierenden Stranges anschließt,
- ebenfalls in das Genom einer Pflanzenzelle unter Verwendung eines rekombinanten Plasmids transfertiert und eingebaut wird und schließlich die so transformierten Pflanzenzellen, die beide Teilstücke enthalten, abermals zu einer ganzen Pflanze regeneriert werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der unter i), iv) oder vii) genannte Promotor der 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus mit den Nukleotiden 6909 bis 7437 ist.
 6. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der unter i), iv) oder vii) genannte Promotor der B33 Promotor eines Patatingens von *Solanum tuberosum* mit den Nukleotiden - 1512 bis + 14 ist.
 7. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Kombination verwendeten Plasmide die Plasmide p35S-anti-BE (DSM 6144) und p35SH-anti-D (DSM 8479) oder Derivate davon sind.
 8. Pflanzenzellen, enthaltend eine DNA-Sequenz-Kombination gemäß den Ansprüchen 1 bis 3.
 9. Verwendung von Pflanzenzellen gemäß Anspruch 8, zur Herstellung von Pflanzen, die hochgradig amylosehaltige Stärke bilden.
 10. Transgene Pflanzen, die hochgradig amylosehaltige Stärke bilden, erhältlich durch das Verfahren gemäß den Ansprüchen 4 bis 7.
 11. Pflanzen gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es die Nutzpflanze Kartoffel ist.
 12. Verwendung der DNA-Sequenz-Kombination gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, zur Herstellung von Pflanzen, die hochgradig amylosehaltige Stärke bilden.
 13. Verwendung der Plasmide p35S-anti-BE (DSM 6144) und p35SH-anti-D (DSM 8479) in Kombination, zur Transformation von Pflanzenzellen mit dem Ziel, in den Zellen die Bildung von hochgradig amylosehaltiger Stärke zu ermöglichen.
 14. Hochgradig amylosehaltige Stärke, isolierbar aus Pflanzen gemäß den Ansprüchen 10 und 11.
 15. Hochgradig amylosehaltige Stärke, isolierbar aus Pflanzenzellen gemäß Anspruch 8.
 16. Verwendung der Stärke gemäß den Ansprüchen 14 und 15, zur Herstellung von Nahrungsmitteln und industriellen Produkten.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen